

## Artigo Original

**UTILIDADE DO HMB-45 E DO KI-67 EM MELANOMA MALIGNO ASSOCIADO A NEVO**

Joana Gomes<sup>1</sup>, Joana Parente<sup>2</sup>, Isabel Viana<sup>3</sup>, Esmeralda Vale<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Dermatologia, Hospital de Braga; <sup>2</sup>Serviço de Dermatologia, Hospital de Santarém EPE;

<sup>3</sup>Centro de Dermatologia Médico-Cirúrgica de Lisboa

**RESUMO – Introdução:** O melanoma maligno surge de novo na maioria das vezes, no entanto em cerca de um terço dos casos ocorre associado a um nevo pré-existente. Nestas situações pode haver dificuldade no diagnóstico histopatológico, particularmente na separação das duas populações celulares e consequentemente na atribuição da espessura tumoral. A marcação imunohistoquímica poderá ser relevante nesta distinção.

**Objectivos:** Avaliar o padrão de marcação imunohistoquímica para HMB-45 e Ki-67 em casos seleccionados de melanoma maligno associado a nevo melanocítico.

**Métodos:** Realizamos marcações imunohistoquímicas para HMB-45 e Ki-67 em 5 nevos intradérmicos, 5 nevos compostos, 5 melanomas e 16 melanomas associados a nevos melanocíticos.

**Resultados:** Nos nevos melanocíticos os melanócitos dérmicos foram consistentemente negativos para HMB-45 e Ki-67. Os melanomas mostraram marcação difusa para HMB-45 e para Ki-67, que variou de intensa a moderada. Nos melanomas associados a nevos a marcação para HMB-45 foi consistentemente positiva no componente de melanoma e negativa no nevo, permitindo a separação das duas populações celulares. Encontramos uma variação considerável na imuno-reactividade para Ki-67 neste grupo.

**Conclusão:** Embora o exame histológico com hematoxilina e eosina seja a principal ferramenta no diagnóstico das lesões melanocíticas, a marcação imunohistoquímica com HMB-45 e Ki-67 poderá ter um papel importante no diagnóstico de melanoma maligno associado a nevo melanocítico.

**PALAVRAS-CHAVE** – Melanoma; Nevo; HMB-45; Ki-67; Imunohistoquímica.

**HMB-45 AND KI-67 STAINING FOR MELANOMA ASSOCIATED WITH NEVI**

**ABSTRACT - Introduction:** The majority of melanomas appear to arise de novo, however in about one third of the cases it can arise in association with a preexisting nevus. The histopathological diagnosis in these situations can be difficult, particularly in the separation of the two cellular populations and, as a consequence, establishing the tumoral thickness. Immunohistochemical staining can help in this distinction.

**Objectives:** To evaluate the immunohistochemical staining patterns of HMB-45 and Ki-67 in selected cases of malignant melanoma associated with melanocytic nevi.

**Methods:** Immunoperoxidase stains for HMB-45 and Ki-67 were done on 5 dermal melanocytic nevi, 5 compound melanocytic nevi, 5 invasive melanomas and 16 melanomas arising in a nevus.

**Results:** The dermal melanocytes of nevi were consistently negative for HMB-45 and Ki-67. The melanomas showed diffuse moderate to intense staining for HMB-45 and Ki-65. In melanomas associated with nevus the HMB-45 was consistently positive in the melanoma component and negative in the nevus, allowing the separation of the two cellular populations. We find a considerable variation in the Ki-67 staining in this group.

**Conclusion:** Although the histopathological examination with hematoxylin and eosin remains the main component in the diagnosis of melanocytic lesions; the immunohistochemical staining with HMB-45 and Ki-67 can be helpful in the diagnosis of melanoma associated with nevi.

**KEY-WORDS** – Melanoma; Nevi; HMB-45; Ki-67; Immunohistochemistry.

# Artigo Original

## Correspondência:

Dr.<sup>a</sup> Joana Maria Botelho Gomes

Serviço de Dermatologia do Hospital de Braga

Largo Carlos Amarante

4700 Braga

E-mail: gbmjoana@yahoo.com

Telefone: 253209022

Fax: 253613334

## INTRODUÇÃO

Embora o melanoma maligno surja *de novo* na maioria dos casos, pode surgir a partir de um nevo melanocítico pré-existente<sup>1-3</sup> numa percentagem que varia de 4,7% a 50% conforme a literatura<sup>4</sup>. Nestas situações poderá haver dificuldades no diagnóstico histopatológico, reflectidas neste intervalo tão vasto, particularmente na separação das duas populações celulares e consequentemente na atribuição da espessura tumoral.

A marcação imunohistoquímica poderá ser relevante nesta distinção<sup>4,5</sup>. Estudos prévios demonstraram diferenças no padrão de marcação imunohistoquímica com HMB-45 e Ki-67 entre melanoma maligno e lesões melanocíticas benignas<sup>6</sup>.

O HMB 45 é um marcador citoplasmático da glicoproteína premelanossomal gp100<sup>7</sup>. Foi um dos primeiros marcadores considerados "específicos" de melanoma a ser descoberto em 1986<sup>6,8</sup>. No entanto, a sua marcação revela-se positiva noutras lesões melanocíticas benignas, como os nevos azuis e os nevos de spitz<sup>4</sup> e também noutros tumores<sup>6,9</sup> que raramente se impõem no diagnóstico diferencial de melanoma, como PComas, tumores das glândulas sudoríparas, melanocitomas meníngeos, sarcomas células claras dos tendões e aponevroses e alguns tumores da mama, ovário e células renais<sup>5</sup>.

Nos nevos melanocíticos comuns, o HMB-45 tem um padrão de marcação imunohistoquímica semelhante ao padrão de maturação dos nevos<sup>4</sup> marcando apenas o componente juncional e por vezes alguns ninhos de melanócitos mais superficiais<sup>6</sup>. As principais excepções são os nevos de spitz, os nevos azuis e lesões relacionadas<sup>6,7</sup>. No melanoma maligno não existe este padrão de maturação, marcando difusamente toda a lesão. O HMB-45 é positivo em cerca de 95% dos melanomas malignos primários, sendo a principal excepção os melanomas desmoplásicos, em que apenas 1/5 dos casos são positivos para HMB-45<sup>5,7</sup>.

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular. Reage com um antígeno nuclear expresso na fase tardia de G1, S, G2 e M do ciclo celular. Nos nevos melanocíticos comuns tem uma imuno-reactividade inferior a 6% das células, marcando geralmente os melanócitos da junção dermoepidérmica ou o componente dérmico superficial.<sup>5,6,10</sup> No melanoma maligno, há um maior número de células e expressarem Ki-67 (13 a 30% dos casos, podendo chegar a 100% em alguns casos). O padrão de marcação no melanoma maligno é mais difuso, heterogéneo e anárquico<sup>9</sup>.

## OBJECTIVOS

Avaliar o padrão de marcação imunohistoquímica com HMB-45 e Ki-67 em casos seleccionados de melanoma maligno associado a nevo melanocítico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizamos marcações imunohistoquímicas com HMB-45 e Ki-67 em 5 nevos melanocíticos intradérmicos, 5 nevos melanocíticos compostos, 5 melanomas invasivos e 16 melanomas associados a nevos melanocíticos.

A marcação imunohistoquímica foi classificada como positiva (+) ou negativa (-). As reacções positivas foram divididas em fraca (+), moderada (++) e intensa (+++).

## RESULTADOS

Os melanócitos dérmicos dos nevos melanocíticos foram consistentemente negativos para HMB-45 e Ki-67.

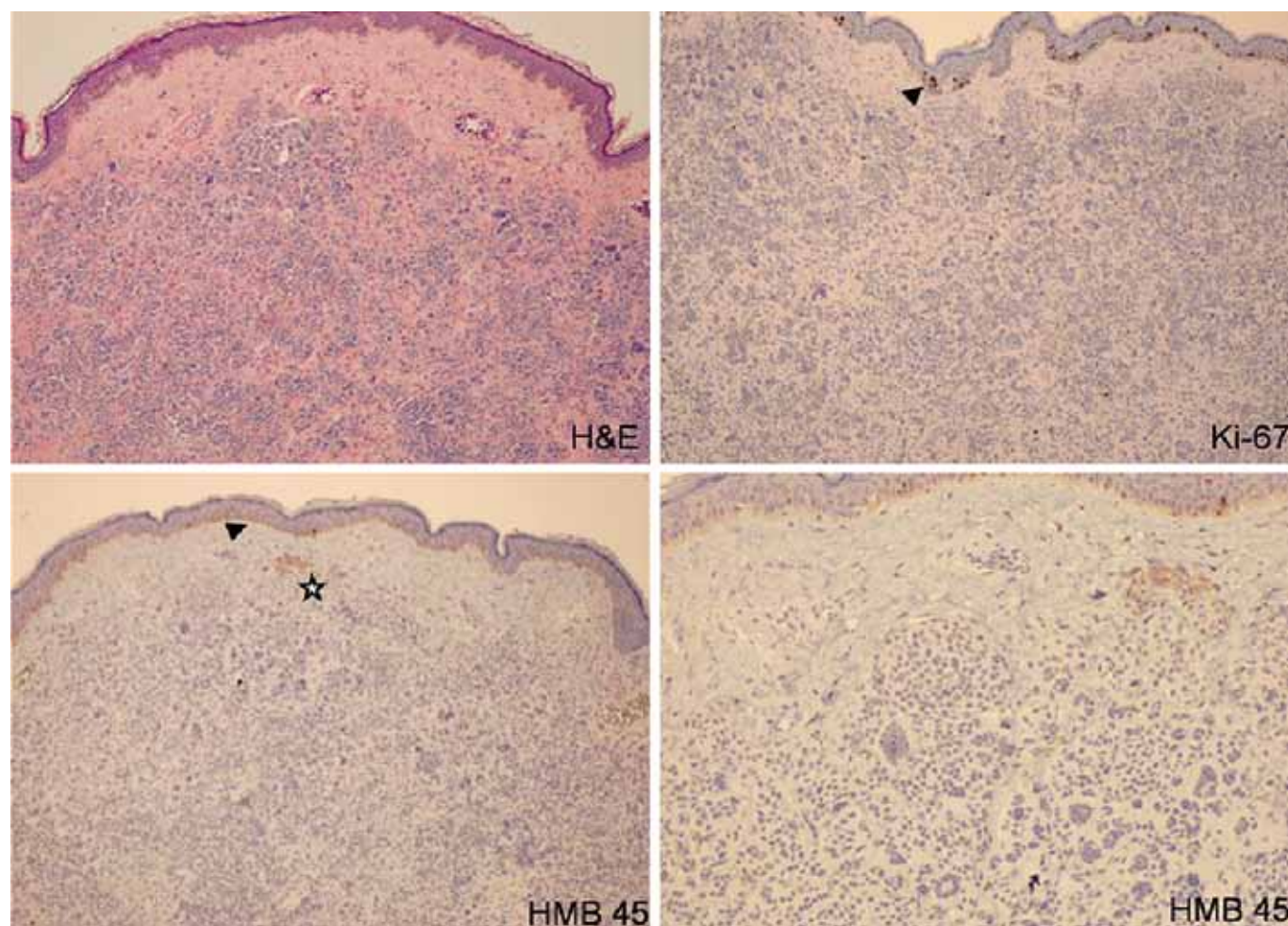
Nos nevos melanocíticos intradérmicos, quer o HMB-45 quer o Ki-67 foram sempre negativos, com a

excepção de um pequeno ninho superficial numa das lesões (Fig. 1).

Nos nevos melanocíticos compostos o HMB-45 marcou sempre os ninhos da junção dermoepidérmica, mas o Ki-67 apenas marcou duas lesões (Fig. 2).

Nos melanomas invasivos do grupo de controlo os dois marcadores foram sempre positivos, com uma marcação que variou de intensa a moderada. Observou-se uma marcação difusa e intensa para HMB-45 em 4 casos e moderada num caso; e imuno-reactividade intensa para Ki-67 em 3 casos e moderada em 2 (Quadro I). Verificamos que a marcação com HMB-45 permitiu identificar com grande facilidade a extensão completa do tumor, bem como facilitou a visualização de pequenos focos de melanoma em profundidade e de imagens de invasão vascular (Fig. 3).

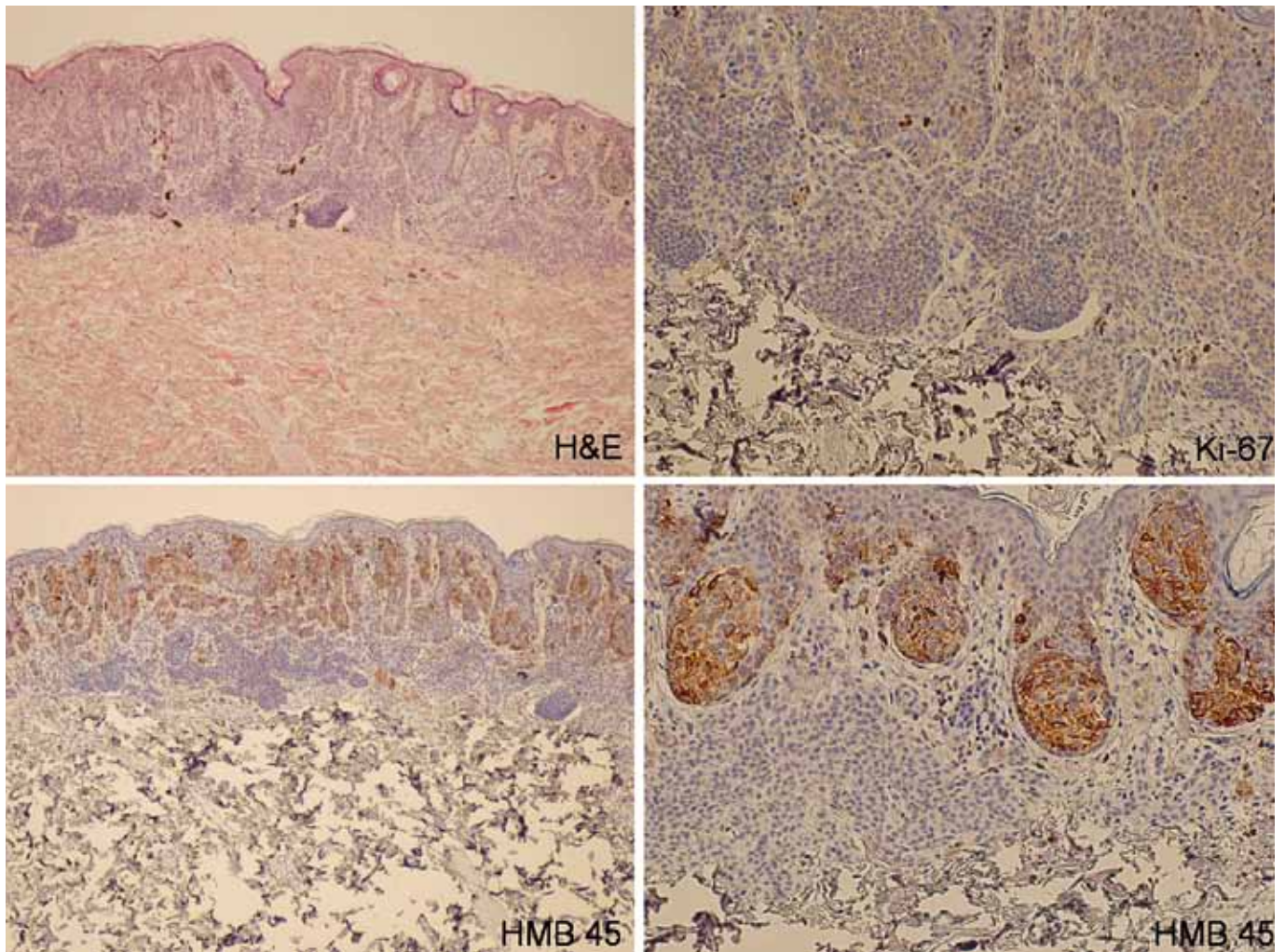
Nos melanomas malignos associados a nevo melanocítico (Quadro II) a marcação com HMB-45 foi consistentemente positiva no componente de melanoma e negativa no nevo, permitindo a separação das duas populações celulares (Fig. 4). Encontramos uma variação considerável na imuno-reactividade para Ki-67 neste grupo, não permitindo na maioria das vezes a distinção clara entre nevo e melanoma. No entanto, houve uma marcação moderada no componente de melanoma na maioria dos casos, foi negativo num caso e fracamente positivo noutro. Em 3 casos foi difícil a avaliação da sua marcação pela presença de infiltrado inflamatório denso, com marcação evidente do componente inflamatório, o que mascarava a observação do componente melanocítico.



**Fig. 1** - Nevo melanocítico intradérmico. Marcação de controlo dos queratinócitos da camada basal (*setas*). Marcação de um pequeno ninho superficial de melanócitos (*estrela*).



# Artigo Original



**Fig. 2** - Nevo melanocítico composto, onde se observa marcação pelo HMB-45 e Ki-67 do componente juncional.

**Quadro I**

## MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO GRUPO DE CONTROLO DE MELANOMA MALIGNO

| HMB-45 | Ki-67 |
|--------|-------|
| +++    | +++   |
| ++     | ++    |
| +++    | ++    |
| +++    | +++   |
| +++    | +++   |

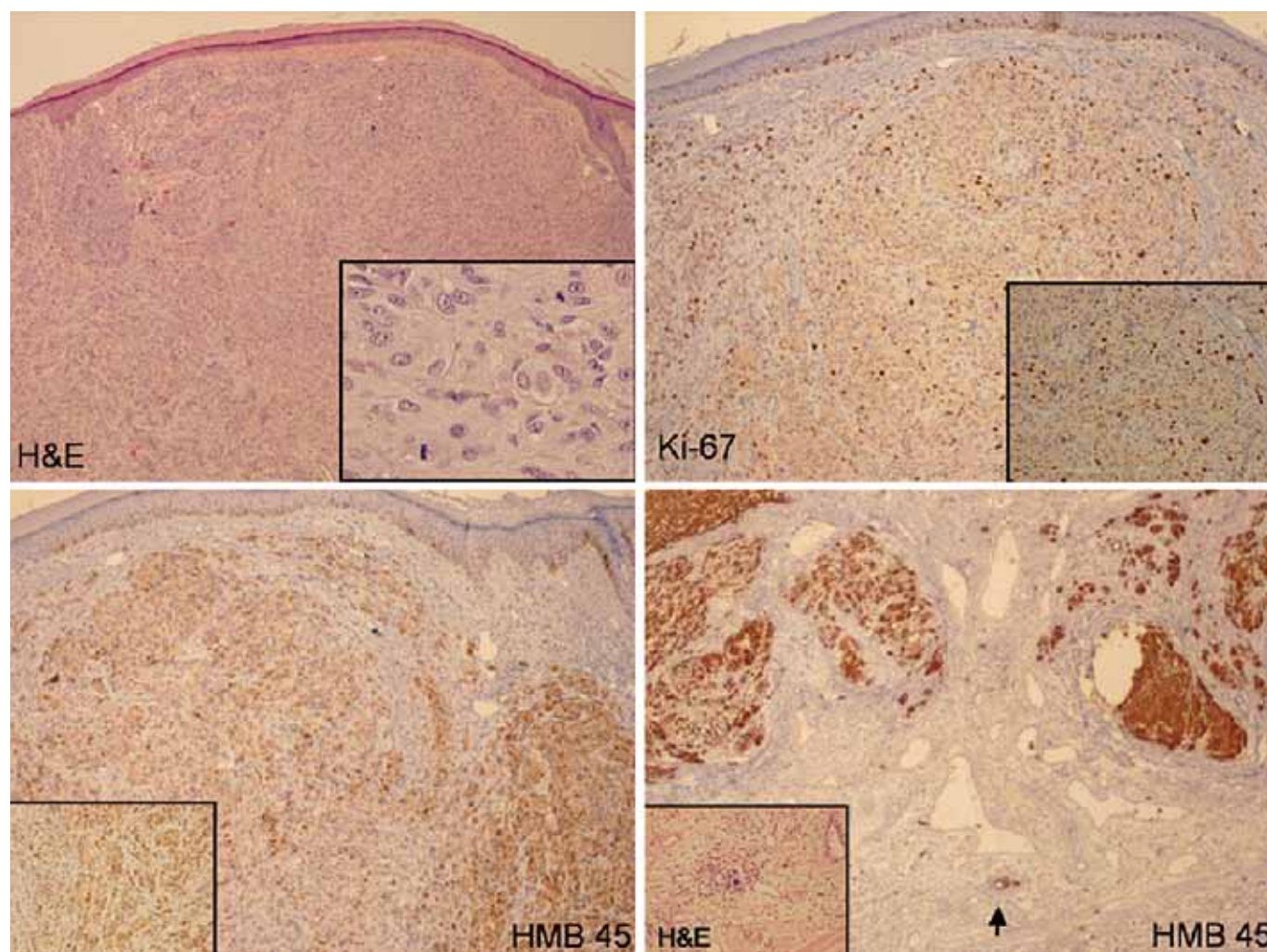
+ marcação fraca; ++ marcação moderada; +++ marcação intensa

## COMENTÁRIOS

O exame histológico com hematoxilina e eosina (H&E) permanece a principal ferramenta no diagnóstico das lesões melanocíticas, no entanto a marcação imunohistoquímica com HMB-45 e Ki-67 poderá ser relevante no diagnóstico de melanoma maligno associado a nevo melanocítico.

No nosso estudo, verificamos um padrão de marcação consistente para o HMB-45 nos melanomas malignos associados a nevo melanocítico, permitindo em todos os casos a separação das duas populações celulares (melanoma versus nevo melanocítico). O HMB-45 revelou-se por isso um marcador fiável na distinção de melanoma e nevo. Permitiu também uma melhor





**Fig. 3** - Melanoma maligno invasivo com marcação intensa para HMB-45 e Ki-67. Na imagem do canto inferior direito, observa-se foco de invasão vascular (seta) evidenciado pela marcação com HMB-45.

visualização da verdadeira extensão do melanoma, permitindo identificar pequenos focos de melanoma em profundidade, consequentemente poderá ter utilidade na atribuição da espessura tumoral em casos de melanoma maligno associado a nevo melanocítico em que esta seja duvidosa na H&E. No entanto, nos casos que incluímos no nosso estudo foi sempre possível atribuir a espessura tumoral na H&E. Foram também identificadas imagens de invasão vascular com maior facilidade do que na H&E.

Para o Ki-67, considerado por alguns autores como um indicador de prognóstico do melanoma maligno<sup>11</sup>, encontramos uma variação considerável na sua imunoreactividade. A sua marcação não foi tão consistente quanto a do HMB-45 e teve um padrão mais anárquico.

Verificamos que a presença de infiltrado inflamatório denso poderá dificultar a leitura da marcação do Ki-67, podendo ser factor de confusão. Tal como outros autores também concluíram a utilização deste marcador pode ser por vezes "misteriosamente desapontante"<sup>4</sup>.

As principais limitações do nosso estudo foram o uso de uma amostra limitada e seleccionada, o facto de não termos incluído variantes histológicas como melanoma desmoplásico, bem como outras lesões melanocíticas benignas como os nevos azuis que pudessem ser factor de confusão na leitura das marcações imunohistoquímicas.

A literatura sobre este tema é muito escassa, sendo necessários mais estudos, com amostras mais extensas, para validar os nossos dados e demonstrar o papel

# Artigo Original

**Quadro II**

**MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO GRUPO DE MELANOMA MALIGNO ASSOCIADO A NEVO MELANOCÍTICO**

| Nevo melanocítico |       | Melanoma |       | Infiltrado inflamatório |
|-------------------|-------|----------|-------|-------------------------|
| HMB-45            | Ki-67 | HMB-45   | Ki-67 |                         |
| –                 | –     | +++      | +     |                         |
| –                 | +     | +++      | ++    |                         |
| –                 | –     | +++      | +     |                         |
| –                 | –     | +++      | ++    |                         |
| –                 | –     | +++      | ++    |                         |
| –                 | –     | +++      | –     |                         |
| –                 | –     | +++      | NA    | +                       |
| –                 | –     | +++      | ++    |                         |
| –                 | –     | +++      | ++    |                         |
| –                 | –     | +++      | ++    |                         |
| –                 | NA    | +++      | +++   | +                       |
| –                 | –     | +++      | ++    | +                       |
| –                 | +     | +++      | +     |                         |
| –                 | –     | +++      | +++   |                         |
| –                 | –     | +++      | ++    |                         |
| –                 | –     | +++      | +++   |                         |

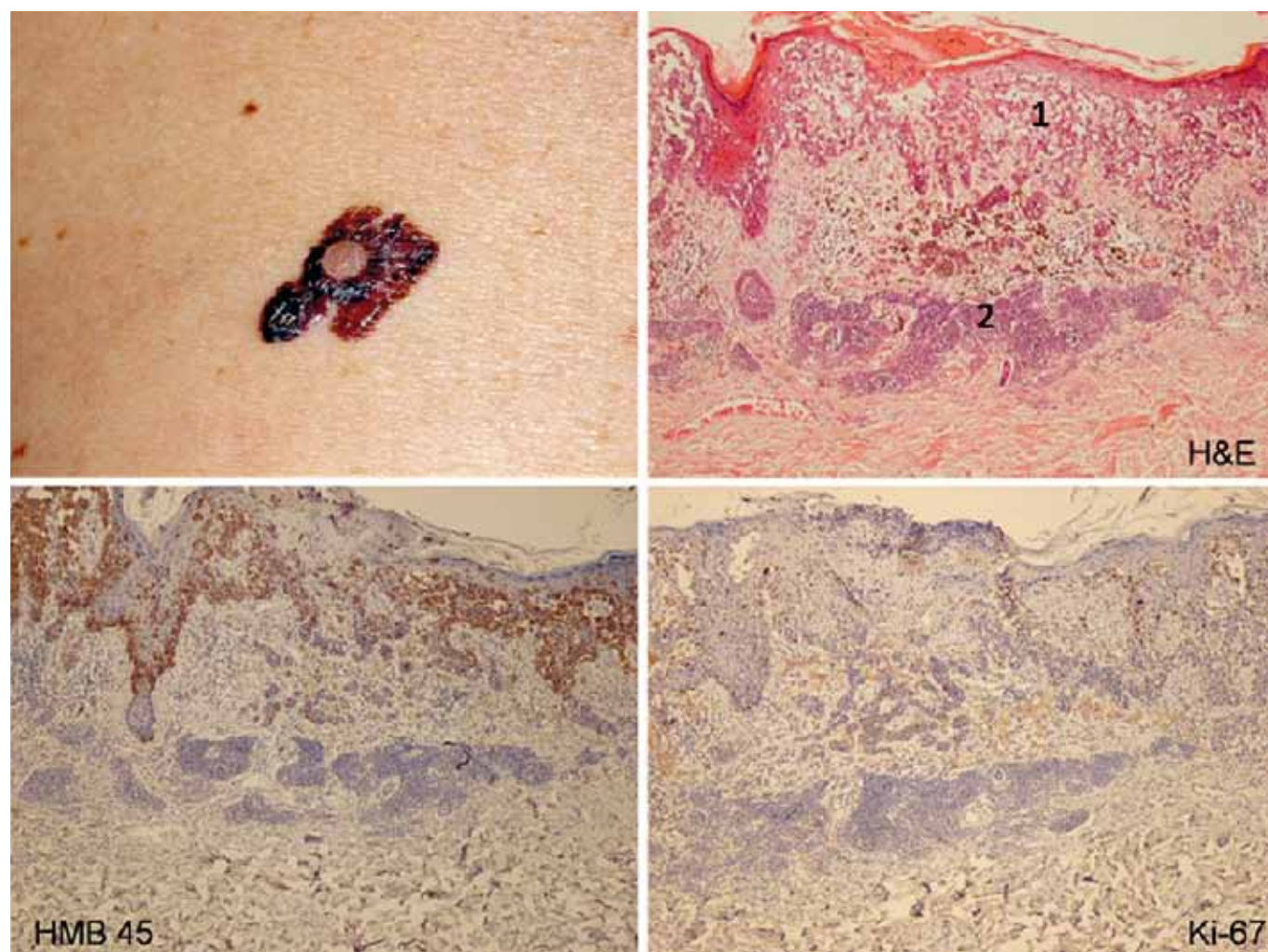
–ausência de marcação; +marcação fraca; ++marcação moderada; +++marcação intensa; NA-não avaliável

importante destes marcadores na avaliação histológica de lesões melanocíticas, principalmente nos casos de melanoma associado a nevo.

## BIBLIOGRAFIA

- Benova C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H: Cutaneous melanomas associated with nevi. Arch Dermatol 139: 1620-4 (2003).
- Weatherhead S, Haniffa M, Lawrence C: Melanomas arising from naevi de novo melanomas – does origin matter? Brit J Dermatol 156: 72-6 (2007).
- Harley S, Walsh N: A new look at nevus-associated melanomas. Am J Dermatopathol 18(2): 137-41 (1996).
- Massi G, LeBoit PE: Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma. Steinkopff Verlag Darmstadt/ Springer Verlag, Berlin, 2004.
- Oshie S, Sarantopoulos G, Cochran A, Binder S: Immunohistochemical characteristics of melanoma. J Cutan Pathol 35: 433-4 (2008).
- Prieto V, Shea C: Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. J Cutan Pathol 35 (Suppl.2): 1-10 (2008).
- Rothberg B, Moeder C, Kluger H, Halaban R, Elder D, Murphy G, et al.: Nuclear to non-nuclear Pmel17/gp100 expression (HMB45 staining) as a discriminator between benign and malignant melanocytic lesions. Modern pathology 21(9): 1121-9 (2008).
- Colombari R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A, et al.: Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumors. Virshows Archiv A Pathol Anat 413: 17-24 (1988).
- Prieto V: Immunohistochemistry and molecular biology in the management of melanocytic lesions. Rev Esp Patol 32: 452-3 (1999).





**Fig. 4** - Melanoma maligno associado a nevo melanocítico. H&E: 1 – componente de melanoma, 2 – nevo melanocítico; HMB 45: ausência de marcação do nevo melanocítico e marcação intensa do melanoma. Ki 67: marcação moderada do melanoma e ausência de marcação do nevo.

10. Nars M, El-Zammar O: Comparison of pHH3, Ki-67, and surviving immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 30(2): 117-22 (2008).
11. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA: Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *Cancer* 14(10):140 (2010).